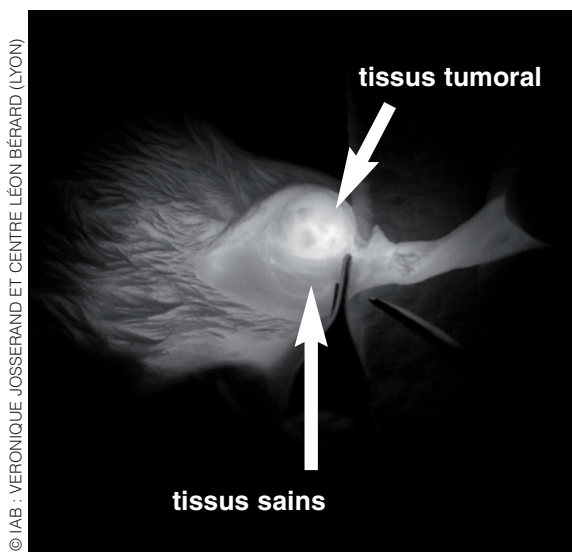


La fluorescence en chirurgie : une application clinique de l'imagerie moléculaire

La chirurgie en oncologie sera un des premiers champs d'application clinique des récents progrès en imagerie de fluorescence. Le développement de nouveaux traceurs ciblant les tumeurs et de systèmes de mesures dans le proche infrarouge permet d'envisager d'assister le geste chirurgical lors de l'exérèse de tumeurs et de la recherche de ganglions drainant une tumeur.

* Fluoptics,
7 parvis Louis Néel, BP 50,
38040 Grenoble cedex 9
** CEA-LETI/Minatoc, DTBS,
17 rue des Martyrs,
38054 Grenoble cedex 9

Philippe Rizo*, Jean-Marc Dinten, Isabelle Texier****



Visualisation des berges d'un ostéosarcome

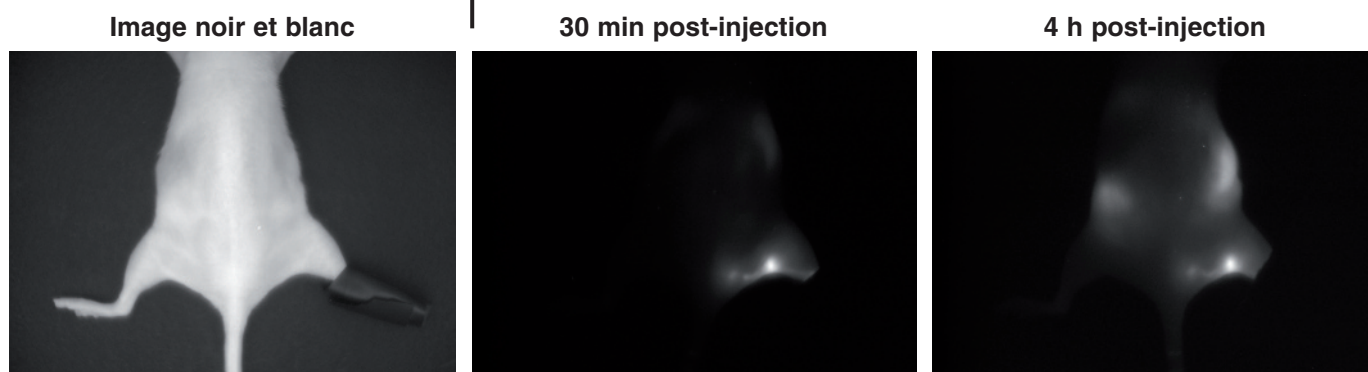
250 µg d'Angiostamp sont injectés dans la veine caudale d'un rat quelques heures avant l'opération, permettant de distinguer les tissus cancéreux des tissus sains et ainsi de réduire la zone à extraire. Les photos ont été réalisées avec le système Fluobeam.

Depuis le début des années 2000, la recherche en imagerie médicale a pris un nouvel essor en s'orientant vers l'imagerie moléculaire, dont l'objectif est de visualiser, directement dans le vivant, des processus biologiques en action au niveau cellulaire. Initialement, ces mécanismes ont été étudiés en microscopie de fluorescence et leur transfert à l'imagerie in vivo a permis de faire émerger cette technique parmi les autres approches plus classiques, telles que le PET (tomographie par émission de positons) ou l'IRM (1). Le transfert de l'imagerie de fluorescence à l'homme doit encore relever un certain nombre de défis techniques qui vont dans un premier temps orienter son application vers de l'imagerie de surface ou peu profonde, comme on en rencontre en chirurgie.

Imagerie moléculaire et fluorescence

Quand un produit de contraste est utilisé en imagerie médicale, celui-ci circule dans le système vasculaire ou s'accumule dans une zone déterminée (par exemple en traversant les vaisseaux poreux qui jouxtent les tumeurs). La qualité de l'image obtenue dépend directement de la quantité de produit injecté et du temps d'intégration utilisé pour la mesure.

Images de fluorescence



© FABRICE NAVARRO CEA-LETIMINATEC

Exemple de drainage lymphatique

Une petite quantité de Sentidye, une émulsion fluorescente, est injectée en intra musculaire. Le produit est drainé par le système lymphatique vers les ganglions les plus proches. Cette méthode peut être utilisée en chirurgie des cancers pour détecter les ganglions qui grainent une tumeur.

En imagerie moléculaire, on injecte également un produit (traceur) qui va être détecté par le système de mesure, mais dont le but est de cibler des molécules impliquées dans le processus biologique étudié. La qualité optimale de l'image va dépendre du nombre de molécules pouvant être ciblées et non plus du nombre de molécules de traceur ; en injectant plus de produit, on n'obtiendra pas forcément une meilleure image. Au contraire, les molécules de traceur qui restent en circulation et qui ne sont pas fixées sur leur cible peuvent générer du bruit de fond. Cette constatation simple permet de comprendre pourquoi l'imagerie moléculaire nécessite d'une part des systèmes d'imagerie ayant une bonne sensibilité et une limite de détection très basse (en général femtomolaire^(*)), et d'autre part des traceurs émettant un signal puissant et s'atténuant peu entre leur zone d'émission et le détecteur.

Face à ces contraintes, la technique de prédilection de l'imagerie moléculaire pour l'imagerie corps entier est naturellement l'imagerie PET, qui utilise des traceurs radioactifs, émettant des photons à 511 keV pouvant traverser de fortes épaisseurs de tissus avec une faible atténuation, et ayant une limite de détection de l'ordre du femtomolaire.

À l'inverse, quand on envisage des examens locaux ou en surface, les techniques d'imagerie de fluorescence, qui ont fait leur preuve en microscopie, reprennent de l'intérêt. Elles sont relativement simples à mettre en œuvre et surtout bien moins coûteuses que les techniques classiques d'imagerie nucléaire.

Les principaux points qui vont limiter la sensibilité de ces méthodes de mesure optiques sont d'une part l'atténuation et la diffusion de la lumière lors de la traversée des tissus, qui va réduire la proportion de lumière émise par le traceur atteignant le détecteur, et d'autre part la fluorescence propre aux tissus biologiques, qui va générer un signal lumineux comparable à celui du traceur et perturber la mesure.

En traversant les tissus biologiques, la lumière est essentiellement atténuée par l'hémoglobine et l'eau. L'hémoglobine atténue très fortement toutes les longueurs d'ondes inférieures à 650-700 nm (tout le spectre visible sauf le rouge profond). L'eau est transparente pour le visible et le très proche infrarouge, mais atté-

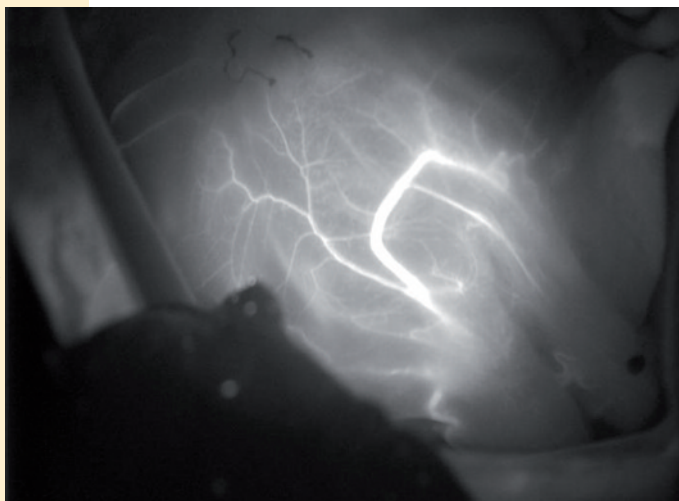
nue très fortement les longueurs d'onde supérieures à 900 nm. Il existe donc une bande de longueurs d'onde à la limite entre le rouge profond et le proche infrarouge (650-900 nm) où la transparence des tissus est maximale. C'est une des raisons pour lesquelles le domaine de développement des marqueurs fluorescents dans le proche infrarouge est en très forte croissance (2). De plus, pendant la traversée des tissus, la lumière n'est pas seulement atténuée ; elle est également fortement diffusée. En épifluorescence (imagerie par réflexion), il n'est pas possible de s'affranchir de cette diffusion. Seules les structures lumineuses en surface ou très proches de la surface pourront être vues avec une bonne résolution.

Enfin, les tissus biologiques fluorescent naturellement. Pour effectuer une mesure avec un marqueur, il faut que la fluorescence du marqueur soit prépondérante par rapport à la fluorescence propre des tissus. Des études menées sur la fluorescence des tissus biologiques ont montré que celle-ci était maximale dans le spectre visible et devenait quasiment négligeable dans le proche infrarouge (3). Le domaine de prédilection de la fluorescence in vivo est donc la mesure de structures en surface ou juste sous la surface, avec des traceurs qui absorbent et émettent dans la bande de longueur d'onde 650-900 nm.

La chirurgie assistée par fluorescence

La chirurgie pratiquée en oncologie présente pour certains types de cancer des caractéristiques très favorables à l'utilisation de la fluorescence. Les structures à examiner (membranes séreuses, muqueuses, peau ou pièces opératoires) se trouvent la plupart du temps en surface ou très proches de la surface observée par le chirurgien. Du point de vue optique, la géométrie de mesure et les paramètres optiques des tissus sont à peu près indépendants des patients, ce qui va permettre de développer une approche générique. La mise en place d'une technique de fluorescence in vivo nécessite le développement de deux éléments clefs : des traceurs qui fluorescent dans le proche infrarouge et une instrumentation compatible avec l'acte chirurgical et capable de visualiser cette fluorescence.

- (1) Weissleder R, Pittet MJ (2008) *Nature* 452, 580-9
- (2) Tsien R (2009) *Angew Chem Int Ed Engl* 48, 5612-26
- (3) Frangioni JV (2003) *Curr Opin Chem Biol* 7, 626-34



© MICHEL BERGER CEALLET/MINATEC

Imagerie intra opératoire en fluorescence du réseau vasculaire cardiaque

Injection intraveineuse d'1ml de Sentidye pendant une opération sur les coronaires d'une brebis. Cette injection permet une visualisation précise du réseau vasculaire cardiaque. Cette acquisition a été réalisée avec le système Fluobeam.

De nombreux traceurs fluorescents ont été étudiés dans le domaine préclinique (étude sur animal) et ont montré la viabilité de cette approche. En revanche, les seuls qui soient en cours d'évaluation clinique ciblent l'activité des protéases, et en particulier des cathepsines^{**2} (4), et celle des intégrines^{**3} de type $\alpha v \beta 3$ (5). Le nombre de traceurs en cours d'évaluation est très restreint car l'introduction d'un nouveau traceur injectable à l'homme repose sur la même démarche que l'introduction d'un nouveau médicament, même s'il s'agit d'une injection unique. Le traceur doit être

produit en qualité clinique : il doit avoir suivi les étapes de préclinique réglementaires et les différentes phases de validation clinique avant de pouvoir être utilisé significativement. Le coût de ces est très élevé et conduit à limiter les risques de toxicité a priori en se focalisant sur des traceurs construits à partir de molécules organiques dégradables par l'organisme et si possible couramment utilisées dans la formulation de produits injectables.

Du point de vue de l'instrumentation, il faut assurer la plus grande compatibilité possible entre l'utilisation de la fluorescence et l'acte chirurgical. Pour cela, l'instrumentation ne doit pas encombrer le champ opératoire et doit être compatible avec son éclairage par une lumière ayant une température et un indice de rendu des couleurs comparables à ce qui est fourni par les plafonniers de salle d'opération. À terme, la fluorescence devra pouvoir être utilisée en endoscopie pour suivre l'évolution de la chirurgie vers des méthodes minimalement invasives. Plusieurs sociétés aux États-Unis et en Europe se sont engagées dans l'industrialisation de techniques de fluorescence pour la chirurgie, que ce soit pour le développement de traceurs ou pour celui d'instrumentations (zoom).

Un atout de taille

Les approches cliniques en imagerie moléculaire par fluorescence commencent tout juste à émerger. D'ici à quelques années, quand les traceurs en cours de tests seront agréés pour l'injection à l'homme, ces techniques pourront être utilisées en routine. Le chirurgien disposera alors d'une information en temps réel sur la biologie en cours au niveau des différentes parties de son champ opératoire pour l'aider dans ses décisions. Cette information supplémentaire devrait conduire à des chirurgies plus précises et plus rapides. ●

(4) Sheth RA *et al.* (2009) *Gynecol Oncol* 112, 616-22

(5) Schottelius M *et al.* (2009) *Acc Chem Res* 42, 969-80

*1 De l'ordre de 10-15 mol/L

**2 Protéases importantes dans la dégradation des protéines par le lysosome

**3 Récepteurs d'adhésion cellulaire

Zoom

Fluoptics

Utiliser l'imagerie de fluorescence pour lutter contre le cancer

En chirurgie oncologique, la distinction entre les tissus tumoraux et les tissus sains n'est pas toujours facile. Le chirurgien n'est alors guidé que par ses sens visuel et tactile, et par son expérience. Aucune technique peropératoire* n'est actuel-

lement disponible pour l'aider à élaborer une cartographie précise de l'extension tumorale.

Créée en février 2009, la société Fluoptics, basée à Grenoble sur le site du complexe Minatec dédié aux micro- et nano-

* Pendant l'acte chirurgical

technologies, souhaite fournir aux chirurgiens oncologues une nouvelle technique d'imagerie en temps réel pour l'assister pendant l'acte chirurgical afin de sécuriser l'élimination de zones tumorales. Fluoptics développe donc une solution combinant un instrument d'imagerie de fluorescence, Fluobeam, et un traceur fluorescent ciblant spécifiquement les tissus tumoraux, Angiostamp, deux technologies brevetées et issues des travaux du CEA-LETI de l'université grenobloise Joseph Fourier, de l'Inserm et du CNRS (1).

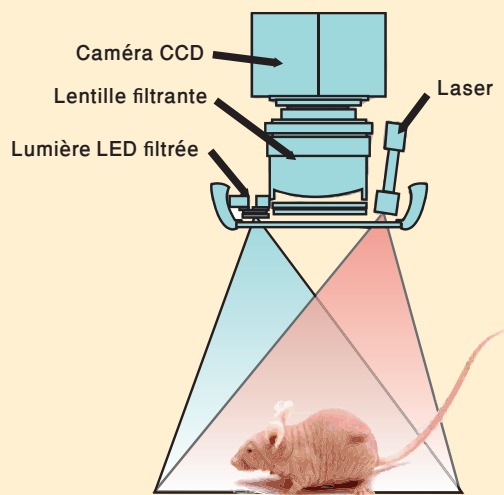
Une fois injecté, le traceur fluorescent se concentre dans les tumeurs qui, quelques heures après l'injection, peuvent être visualisées par fluorescence. Une image en temps réel du champ opératoire montrant les zones fluorescentes est affichée sur un écran pour permettre au chirurgien de visualiser les marges des tumeurs, protéger les structures vitales saines et vérifier la bonne élimination des zones tumorales (une vidéo est disponible sur le site de l'entreprise). Le geste chirurgical est alors plus précis, plus complet et plus rapide. Un premier partenariat avec le Centre Léon Bérard de lutte contre le cancer de Lyon a déjà été signé en 2009 afin de réaliser les preuves de concept de ces technologies. Cette solution est en cours de transfert vers la clinique et les premiers essais cliniques seront réalisés en 2011.

Le traceur

L'AngioStamp, est un marqueur moléculaire qui cible des intégrines $\alpha v \beta 3$ surexprimées dans l'angiogenèse et dans de nombreuses tumeurs cancéreuses. La visualisation pendant la chirurgie des zones sur lesquelles se concentre le marqueur fournit une réelle information biologique in vivo sur le niveau d'expression des intégrines $\alpha v \beta 3$ dans les tissus, aidant ainsi le chirurgien à caractériser les zones cancéreuses. Ce marqueur a fait l'objet d'un brevet international et d'une dizaine de publications (2-4).

Système de mesure

La zone d'intérêt est éclairée par une lumière blanche ne contenant pas d'infra rouge et permettant la chirurgie sur la zone éclairée. Un laser dans le proche infra rouge est diffusé sur cette même zone pour exciter la fluorescence du marqueur. Celle-ci est détectée par une caméra CCD filtrée qui ne voit que le proche infra rouge.



Le système d'imagerie

Le lecteur Fluobeam fournit en temps réel une image quantitative de la fluorescence dans le champ opératoire. L'absorption des marqueurs de Fluoptics est maximale dans le rouge profond et leur émission est maximale dans le proche infrarouge. Or l'œil voit très difficilement ces longueurs d'ondes. Fluoptics a donc développé et optimisé une technique de filtrage qui permet d'effectuer les mesures de fluorescence dans le proche infrarouge pendant que la zone examinée est éclairée avec une lumière blanche de bonne qualité. Le lecteur qui en résulte assure ainsi simultanément une fonction d'éclairage en lumière blanche de la zone observée du champ opératoire, l'excitation de la fluorescence à l'aide d'un laser diffusé sur le champ et l'acquisition de l'image de fluorescence avec une caméra CCD (charge coupled device, très sensible, compatible avec des temps de mesure longs) filtrée pour ne voir que les longueurs d'ondes correspondant à la fluorescence.

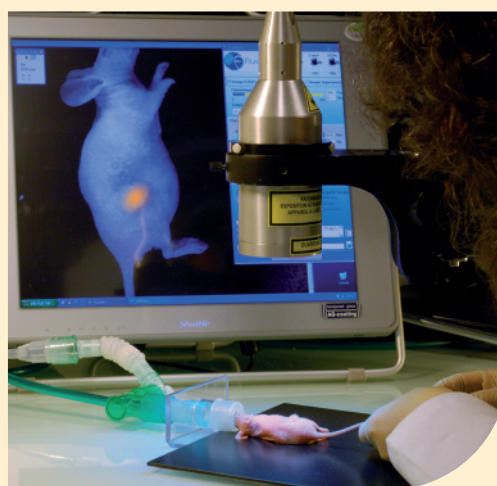
Le marché préclinique, en attendant la commercialisation du produit clinique

Les produits Fluoptics, Fluobeam et AngioStamp sont déjà commercialisés au niveau international via un réseau de distributeur sur le marché préclinique et utilisés dans le cadre de travaux de recherche sur animaux in vivo, et plus particulièrement dans le cadre de la recherche sur le cancer. Pour cette première année d'activité l'entreprise, va réaliser 200 K€ de chiffre d'affaires et emploie cinq personnes. ●

Philippe Rizo
philippe.rizo@fluoptics.com

Pour en savoir plus : www.fluoptics.com

- (1) Dumy P et al.,
Synthèse et caractérisation de nouveaux systèmes de guidage et de vectorisation de molécules d'intérêt thérapeutique vers des cellules cibles, brevet européen : EP 1539804 Délivré le 03/01/2007
(2) Cyclic adhesion inhibitors, Jonczyk A et al., EP 0770622 délivré le 02/02/2000
(3) Razkin J et al. (2006) *Chem Med Chem* 1, 1069-1072



© FLUOPTICS